

UNTERSUCHUNGEN DER CYTOGENETISCHEN WIRKUNG
VON AZATHIOPRIN IN MENSCHLICHEN LYMPHOZYTEN
NACH CHEMOTHERAPIE UND IN
VITRO APPLIKATION

Florian Apelt

1979

Aus dem Institut für Biologie, Abteilung für Strahlen-
biologie, der Gesellschaft für Strahlen- und Umwelt-
forschung mbH München
(Leiter: Prof. Dr. U. Hagen)

Untersuchungen der cytogenetischen Wirkung von Azathioprin
in menschlichen Lymphozyten nach Chemotherapie und in
vitro Applikation

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Florian Apelt
aus München
1979



Mit Genehmigung
des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. M. Bauchinger
Mitherberichterstatter:	Prof. Dr. med. H. Spiess
Dekan:	Prof. Dr. med. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	23.10.1979

Gliederung

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methode	3
2.1. In vivo Untersuchungen	3
2.2. In vitro Untersuchungen	8
2.3. Lymphozytenkultur und Chromosomenpräparation .	10
2.4. Chromosomenanalyse	12
2.5. Statistische Auswertung	14
3. Ergebnisse	15
3.1. In vivo Untersuchungen	15
3.2. In vitro Untersuchungen	20
4. Diskussion	24
4.1. Chromosomenanalyse in vivo	24
4.1.1. Untersuchungen an peripheren Lymphozyten . .	24
4.1.2. Untersuchungen an Knochenmarkszellen	37
4.2. Chromosomenanalyse in vitro	39
4.3. Befunde im Mikro-Nucleus- und SCE-Test	46
4.4. Teratogene Effekte	47
4.5. Cytogenetische Befunde in Tierversuchen . . .	49
4.6. Abschließende Bewertung	49
5. Zusammenfassung	52



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554612_0079

1. Einleitung

Azathioprin (Imuran^R, Imurek^R, Burroughs, Wellcome & Co., London) hat als Immunsuppressivum längst Eingang in die klinische Anwendung gefunden. Sein Anwendungsbereich ist außerordentlich groß:

Autoimmunerkrankungen, wie chronisch aggressive Hepatitis, Lupus Erythematoses, chronische Polyarthrit, Colitis ulcerosa, Morbus Crohn, Pemphigus vulgaris und verschiedene Kollagenosen werden seit Jahren erfolgreich immunsuppressiv behandelt (34, 44, 52, 54, 58, 62, 76).

Eine klassische Indikation für die Anwendung von Azathioprin stellt heute die Transplantation von Organen, am häufigsten der Niere, dar (15).

Mit Erfolg wird Azathioprin auch bei einer Reihe von Erkrankungen eingesetzt, über deren autoimmune Pathogenese noch diskutiert wird, so bei der steroidresistenten proliferativen Glomerulonephritis, der Werlhofischen Erkrankung, der Myasthenia gravis und der multiplen Sklerose (MS.) (10, 22, 26, 51, 79).

Bereits 1974 (78) wurde die Zahl der an Autoimmunerkrankungen leidenden und mit Azathioprin behandelten Patienten auf 30 000 geschätzt, hinzu kommen etwa ebensoviele Transplantationspatienten, deren Zahl noch weiter ansteigen wird.

Ist die Diskussion um die klinischen Nebenwirkungen von Azathioprin (allergische Reaktionen, reversible Knochenmarksdepressionen, vereinzelt Cholestasen und Niereninsuffizienzen) mittlerweile beendet (53), so herrscht noch keine Klarheit über teratogene und mutagene Effekte. Gerade dieser Frage sollte aber besondere Beachtung geschenkt werden, befindet sich doch ein großer Prozentsatz immunsuppressiv behandelter Patienten im fortpflan-

zungsfähigen Alter.

Über teratogene Wirkungen beim Menschen wird in 5 Fällen berichtet (13, 45, 68, 83), wobei aber Azathioprin als das allein auslösende Reagens umstritten ist.

Im Rahmen der Untersuchungen über eine mutagene Wirkung von Azathioprin liegen eine Reihe widersprüchlicher cytogenetischer Befunde, sowohl bei behandelten Patienten, als auch nach in vitro Applikation menschlicher Zellen, vor. Über erhöhte Chromosomenaberrationsraten in Lymphozyten und Knochenmark wird von 6 Autorengruppen (23, 24, 30, 31, 32, 33, 39, 40, 72) berichtet. Von 7 Arbeitsgruppen wurden negative Befunde erhoben (17, 25, 47, 63, 65, 69, 75). Nach in vitro Applikation peripherer Lymphozyten liegen ebenfalls positive (55, 74) und negative (28, 41) Befunde vor.

Eine erhöhte Anzahl "reversibler" Chromosomendefekte in Lymphozyten Neugeborener, von denen ein Elternteil während Konzeption oder Schwangerschaft Imurek^R einnahm, wird von 3 Autoren (43, 60, 82) beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wird versucht, mit Hilfe ergänzender in vivo und in vitro Untersuchungen sowie durch eine kritische Bewertung der bisher publizierten widersprüchlichen Befunde, zu einer klaren Aussage über die cytogenetische Wirkung von Azathioprin zu kommen.

2. Material und Methode

2.1. In vivo Untersuchungen

Für die in vivo Untersuchungen sollte ein genügend grosses Patientengut gefunden werden, das an der gleichen Krankheit leidet, Azathioprin in vergleichbaren Dosen und über längere Zeit eingenommen hat. Von Patienten, die an der Neurologischen Universitätsklinik München wegen einer Multiplen Sklerose (Encephalitis disseminata) in Behandlung standen, wurden Chromosomenanalysen durchgeführt.

Diese Patienten erfüllten in idealer Weise die geforderten Kriterien.

1. Es handelte sich ausschließlich um ambulante Patienten, bei denen eine zusätzliche Erkrankung, die Einfluß auf die Chromosomenbefunde nehmen konnte, nicht vorlag.
2. Da sich die Multiple Sklerose mit Azathioprin günstig beeinflussen läßt, lag die Indikation zu einer Langzeittherapie vor.
3. Durch die Langzeittherapie war die Möglichkeit gegeben, Patienten zu untersuchen, die relativ hohe Dosen akkumuliert hatten.
4. Nach einer mehrjährigen Einnahmezeit wird bei MS-Patienten Azathioprin abgesetzt und erst bei einem neu auftretendem Schub wieder verordnet. Ein chromosomenschädigender (clastogener) Effekt von Azathioprin, der möglicherweise nach Absetzen des Medikaments anhielt, war somit einer Untersuchung zugänglich.
5. Weitere therapeutische Maßnahmen zur Behandlung der MS, wie Kortikosteroide oder physikalische Therapie, zeigen ebensowenig wie die mittlerweile verlassene Ductus-Thoracicus-Drainage oder das Antilymphozytenglobulin (5) eine cytogenetische Wirkung.

Als Vergleichsgruppe diene ein Kollektiv gesunder, freiwilliger Versuchspersonen.

Insgesamt wurden 38 Probanden erfaßt, die bisher weder einer beruflichen noch einer erhöhten medizinischen Strahlenexposition ausgesetzt waren. Auch eine cyto-statische Behandlung lag nicht vor. Es wurden vier Untersuchungsgruppen gebildet:

Gruppe 1 besteht aus 10 MS-Patienten, die zur Zeit der Blutentnahme jeweils 150 mg Imurek^R täglich einnahmen. Die mittlere Einnahmedauer betrug bei einer Spannweite von 14 Tagen bis 38 Monaten, 15 Monate. Die kumulierte Azathioprin-Dosis belief sich im Mittel auf 73 g (Tab. 1).

Gruppe 2 bilden ebenfalls 10 MS-Patienten, die sich nach dem Absetzen des Azathioprin im therapiefreien Intervall befanden. Durchschnittlich nahm diese Gruppe 160 g Imurek^R über einen Zeitraum von 3 Jahren ein. Der Zeitpunkt der letzten Azathioprin-Einnahme lag mehrere Monate bis Jahre zurück (Tab. 2).

Gruppe 3 setzt sich aus 8 MS-Patienten zusammen, die nie Azathioprin einnahmen. Da die günstige Wirkung von Imurek^R, vor allem hinsichtlich eines akuten Schubs, bereits bei der Verdachtsdiagnose genutzt wird, ist es schwierig, eine genügend große Anzahl unbehandelter Kranker mit gesicherter Diagnose zu erfassen. Anfangs umfaßte diese Gruppe ebenfalls 10 Patienten, von denen aber 2 ausgeschieden werden mußten, da sich im Verlauf die Diagnose Multiple Sklerose nicht bestätigte (Tab. 3).

Gruppe 4 besteht aus 9 freiwilligen gesunden Versuchspersonen. Das Alter dieser Gruppe entspricht mit durchschnittlich 34 Jahren dem des MS-Patientenguts, bei dem eine typische Bevorzugung des jüngeren Erwachsenenalters vorliegt. Von der 10. Kontrollperson liegt eine höhere

Tabelle 1: MS-Patienten unter Azathioprin-Therapie (Gruppe 1)

Name	Alter und Geschlecht	Diagnose der MS	seit	Azathioprin-Therapie mg/Tag Dauer/Monate		kumulierte Dosis (g)	sonstige Therapie
A.G.	28 ♀	schubförmig	1960	150	60	270	Prednison, ALG, Duct.thor.Drain.
S.K.	26 ♀	chronisch	1974	150	1	5	Prednison
W.K.	43 ♀	schubförmig	1972	150	15	36	Prednison
E.F.	33 ♂	chronisch	1974	150	8	36	Prednison
G.F.	25 ♀	schubförmig	1967	150	0,5	2	Prednison
A.W.	41 ♂	schubförmig	1967	150	9	41	Prednison
J.H.	36 ♂	chronisch	1967	150	1	5	Prednison
I.E.	21 ♂	schubförmig	1972	150	16	72	Prednison
M.W.	26 ♀	schubförmig	1969	150	13	59	Prednison
R.F.	42 ♀	schubförmig	1969	150	38	171	Prednison

Tabelle 2: MS-Patienten nach Azathioprin-Therapie (Gruppe 2)

Name	Alter und Geschlecht	Diagnose der MS	seit	Azathioprin-Therapie			Therapie frei seit (Mon.)	sonstige Therapie
				mg/Tag	Dauer/Monate	kumulierte Dosis (g)		
E.A.	48 ♀	schubförmig	1969	150	60	270	12	
A.v.B.	24 ♀	schubförmig	1973	150	3	14	7	
F.A.	28 ♂	schubförmig	1968	150	60	270	9	ALG + Duct.- thor.-Drain.
I.R.	28 ♀	schubförmig	1967	150	64	288	12	
S.F.	41 ♀	schubförmig	1963	100	25	117	28	
O.F.	25 ♀	chronisch	1968	150	27	122	29	
A.K.	39 ♀	schubförmig	1968	150	13	59	48	
E.N.	23 ♀	schubförmig	1969	150	50	225	13	
E.M.	43 ♀	chronisch	1970	150	24	108	24	
A.E.	42 ♀	schubförmig	1968	150	27	126	29	

Tabelle 3: Unbehandelte MS-Patienten (Gruppe 3)

Name	Alter und Geschlecht	Diagnose der MS	seit	sonstige Therapie
I.S.	56 ♀	chronisch	1972	
I.M.	36 ♀	schubförmig	1975	Prednison
F.P.	37 ♂	schubförmig	1975	Prednison
I.L.	51 ♀	chronisch	1960	
H.S.	30 ♂	schubförmig	1975	
W.S.	40 ♂	schubförmig	1976	Prednison
F.I.	37 ♀	schubförmig	1966	
L.T.	31 ♂	schubförmig	1974	

Anzahl ausgewerteter Zellen vor; es handelt sich um die zusammengefaßten Kontrollbefunde zu den in vitro Versuchen.

Zur Chromosomenanalyse in kleinen Lymphozyten wurden von jedem Probanden 5 ml Blut mit Heparin steril aus der Armvene entnommen und jeweils 2 Kulturen angelegt.

2.2. In vitro Untersuchungen

Bei in vitro Untersuchungen wurden in 4 Versuchsansätzen kleine Lymphozyten im Vollblut, mit Azathioprin-Konzentration von 1 - 400 μg / ml behandelt. Alle Lymphocyten-Kulturen wurden mit Eigenblut durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen lag keine Erkrankung vor, eine frühere Strahlen- oder Zytostatikabehandlung bestand nicht.

Zur Applikation wurde Azathioprin in wasserlöslicher Form (Imurek pro injectione^R, Burroughs Wellcome) verwendet.

Die getesteten Azathioprinkonzentrationen wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt:

Der mittlere Blutspiegel therapeutischer Dosen behandelter Patienten beträgt nach Messungen (20), wie rechnerisch, ausgehend von einer Tagesdosis von 150 mg und einer 70 kg schweren Normalperson, ungefähr 2 μg / ml. Diese Konzentration wurde als mittlere Dosis des therapeutischen Bereichs getestet. Um Schwankungen des Blutspiegels zu berücksichtigen, kamen Testkonzentrationen von 1 und 4 μg / ml hinzu.

Zusätzlich wurden noch 3 Dosen im cytotoxischen Bereich untersucht. Hierzu wurde in Vorversuchen zunächst mit 500 μg / ml jene Azathioprinkonzentration ermittelt, bei der die Zellen zwar noch nicht abstarben, aber unter ge-

gegebenen Kulturbedingungen keinerlei Mitoseaktivität mehr zeigten. 400 µg / ml wurde als höchste applizierte Dosis gewählt, da hier eine ausreichende Mitoseaktivität vorhanden war. Mit 40 und 100 µg / ml entsprachen 2 weitere Testdosen der 20- bzw. 50-fachen mittleren therapeutischen Dosis.

Als Kontrollen dienten Kulturen mit dem Zusatz von 1 ml 0,9% NaCl-Lösung.

Bei den in vitro Versuchen sollte auch der Einfluß von Azathioprin auf die Chromosomenstruktur während der verschiedenen Phasen des Zellzyklus erfaßt werden. In Anlehnung an Untersuchungen von DUDIN und Mitarb. (1974), die mittels Autoradiographie an PHA-stimulierten Lymphozyten die Dauer der Zellzyklusphasen (G_1 : 0-26^h, S: 26-45^h, G_2 /Mitose: 45-48^h) bestimmten, wurden folgende Versuche durchgeführt:

Versuch 1: Nach der Blutentnahme wurde den Zellen im Vollblut 3 Stunden lang Azathioprin in den Testkonzentrationen angeboten. Einem dreimal durchgeführten sterilen Waschvorgang (Zentrifugation, Absaugen des Überstandes, zweimaliger Suspension mit Hank'scher Lösung, einmal mit F-10 Medium) folgte die Lymphozytenkultur für eine Dauer von 48 Stunden. Mit dieser Applikationsform wurden Chromosomenveränderungen erfaßt, die in der G_0 -Phase des Zellzyklus induziert werden.

Versuch 2: Die Zellen wurden in der Kultur, in Gegenwart des Mitogens PHA während der ersten 24 Stunden mit Azathioprin behandelt. Nach dieser Einwirkungszeit wurden die Zellen dreimal gewaschen, und weitere 24 Stunden kultiviert. Hierbei wurden die Zellen während des durch PHA stimulierten Transformationsprozesses überwiegend in der G_1 -Phase exponiert.

Versuch 3: Nach 24^h Kulturzeit ohne Testsubstanz wurde den Kulturen Azathioprin für die folgenden 24 Stunden zugesetzt. Während dieser Einwirkungszeit durchlaufen die meisten Zellen die S-, G₂- und Mitosephase.

Versuch 4: Nach 45^h Kulturzeit wurden die Testkonzentrationen für 3 Stunden angeboten und daran anschließend die Kultur abgebrochen. Auf diese Weise konnte die G₂- und Mitosephase erfaßt werden.

Für die Kontrollen und die Dosen 1 bis 40 µg/ml wurden jeweils 2, für die beiden höchsten Konzentrationen 4 Kulturen angelegt.

2.3. Lymphozytenkultur und Chromosomenpräparation

Die Chromosomenanalyse erfolgte in peripheren Lymphozyten, die in standardisierten Mikrokulturen gehalten wurden. Eine Kultur hatte folgende Zusammensetzung: 4 ml F-10 Medium (Gibco-Biocult, Glasgow), 1000 IE Penicillin und Streptomycin (Grünenthal, Stolberg) pro ml Medium, 0,5 ml fetales Kälberserum (Difco Laboratories, Detroit), 0,13 ml Phytohämagglutinin PHA (Difco), 0,5 ml Vollblut, das mit dem Zusatz von 50 E Heparin (Liquemin^R Hoffman-La Roche, Grenzach) frisch aus einer peripheren Vene gewonnen wurde. Nach G₀-Applikation (Versuch 1) wurde den Kulturen die in 0,5 ml Blut enthaltenen Lymphozyten in 0,5 ml F-10 Medium beigegeben.

Alle Bestandteile wurden steril in 10 ml fassende Erlenmeyerkölbchen gefüllt und die verschlossenen Kulturgefäße bei einer konstanten Temperatur von 37^o C für 48^h inkubiert.

3^h vor Kulturende erfolgte zur Anreicherung von Metaphasen der Zusatz des Spindelgifts Colcemid^R (Ciba,

Basel), in einer Konzentration von 0,15 µg/ml.

Zur Chromosomenpräparation wurde die Kulturflüssigkeit in Zentrifugengläser umgefüllt, 5 Minuten bei 1000 UpM zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellsediment wurde mit 5 ml Hank'scher Lösung (37° C) suspendiert und für 5 Minuten bei gleicher Umdrehungszahl zentrifugiert. Nach Absaugen der Waschlösung wurden die Zellen in einer hyptonen Lösung, bestehend aus 0,4 ml Hank's und 1,6 ml Aqua bidest neun Minuten bei 37° C inkubiert. Die Hypotonie dieser Lösung war so eingestellt, daß die Erythrozyten zerstört werden, während die Lymphozyten durch ihre stärkere osmotische Resistenz lediglich aufquellen. Dadurch wird die spätere Spreitung der Chromosomen auf den Objektträgern begünstigt, was zu qualitativ besseren Metaphaseplatten führt. Der Inkubation schloß sich eine erneute Zentrifugation von 5 Minuten Dauer bei 900 UpM an. Da unter den gegebenen Kulturbedingungen nur kleine Lymphozyten (T-Lymphozyten) Kern- und Zellteilungen durchführen, erhält man nach Absaugen des Erythrozytendetritus entsprechende Zellsuspensionen für die Chromosomenpräparation.

Die Zellen wurden nun in einem Gemisch aus Eisessig und Methanol im Verhältnis 1:3 für 30 Minuten fixiert. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde soviel an Überstand abgesaugt, daß je nach Zelldichte eine Suspension von etwa 0,5 ml verblieb. Pro Präparat wurden jeweils 3 Tropfen dieser Suspension auf einen fettfreien, mit Eiswasser gekühlten Objektträger getropft und kurz durch eine Bunsenflamme gezogen. Dabei breiten sich die Chromosomen der einzelnen Metaphasen flach aus, und können nach Anfärbung analysiert werden.

Die Färbung erfolgte nach einer kombinierten Feulgen-Orcein-Eisessig-Methode. Dazu wurden die Präparate zunächst in 1n Salzsäure für 9 Minuten bei einer Temperatur von 60^o C hydrolysiert. Nach Abspülen mit kaltem Wasser wurden sie in ein Färbebad mit fuchsin-schwefeliger Säure gebracht und verblieben darin 2 Stunden. Die Objektträger wurden dann kurz mit Wasser gespült und mehrere Stunden bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Hieran schloß sich für 9 Minuten die Orcein-Eisessig-Färbung an. Nach Durchlaufen einer ansteigenden Alkoholreihe (Äthanol 96 %, zweimal Isopropylalkohol 99 %, Isopropylol/Xylol im Verhältnis 1:1 und zweimal Xylol) wurden die Präparate mit Caedax^R (Merck, Darmstadt) eingedeckt und 12^h bei 40^o C getrocknet.

2.4. Chromosomenanalyse

Für die Chromosomenanalyse wurden bei in vitro Applikation von Azathioprin pro Konzentration 200, in der Kontrolle je 300 Metaphaseplatten ausgewertet. Bei den in vivo Untersuchungen wurden pro Person jeweils 200 Metaphasen erfaßt. Insgesamt wurden 12 000 Zellen analysiert.

Die Metaphasen wurden zunächst bei 200-facher Vergrößerung im Phasenkontrastmikroskop nach folgenden Kriterien ausgewählt:

1. Gleichmäßige Färbung aller Chromosomen
2. Gute Spreitung in nicht zerrissenen Metaphaseplatten.

Im Idealfall lagen die 46 Chromosomen getrennt voneinander vor. Bei guter Färbung lassen sich aber auch vereinzelt übereinanderliegende Chromosomen gut beurteilen, so daß dieses Phänomen, wenn es nicht zu häufig auftrat, keinen Ausschluß dieser Mitose nach sich zog.

Präparationsbedingte zerrissene Metaphasen mit weit verstreuten Chromosomen wurden nicht registriert.

3. Mitosestadium. Ideal zur Auswertung ist die frühe Metaphase, ein Zustand, in dem die Chromosomen noch nicht zu sehr kontrahiert sind, und somit auch kleinere Defekte gut sichtbar sind. Die beginnende C-Anaphase ist ungeeignet, da die Chromatiden der einzelnen Chromosomen nicht mehr in jedem Fall einander zugeordnet werden können. Zudem beginnt bereits in diesem Stadium eine gewisse Entspiralisierung der Chromosomenstruktur, die in Einzelfällen die Abgrenzung von einem tatsächlichen Defekt erschwert.

Die Kreuztischkoordinaten der auf diese Weise ausgewählten Mitosen wurden zur Endauswertung protokolliert.

Die eigentliche Chromosomenanalyse erfolgte mit Öl-immersion am Phasenkontrast bei 1600-facher Vergrößerung.

Zunächst wurden in den Metaphaseplatten die vorhandenen Einzelstrukturen und Centromere gezählt. Nur Zellen mit einem kompletten Chromosomensatz von 46 Centromeren wurden akzeptiert. Anschließend wurde die Struktur der einzelnen Chromosomen überprüft. Konnte durch die mikroskopische Analyse keine eindeutige Bestimmung eines Defekts erzielt werden, wurde die Mitose fotografiert und dann ausgewertet. Brachte auch das Bild keine Klärung, wurde ein Karyogramm angefertigt.

Die vorhandenen Chromosomendefekte wurden registriert, die analysierten Zellen nach einem Ordnungsschema von BAUCHINGER und HUG (1966) klassifiziert:

N-Zellen: Zellen mit normalem Chromosomenmuster

S-Zellen: Zellen mit strukturellen Chromosomendefekten, wie Bruchstückverluste (acentrische Fragmente, Chromatidbrüche) oder Strukturumbauten (chromosomale und chromatidale Austauschprozesse).

U-Zellen: Zellen mit unspezifischen Defekten, wie achromatische Lücken (gaps, isogaps), also Veränderungen der Chromosomenstruktur, die keine echten Diskontinuitäten voraussetzen.

2.5. Statistische Auswertung

Für die statistische Analyse der in vivo Untersuchungen wurde der U-Test nach MANN und WHITNEY (1962) benützt. Die Voraussetzungen zur Anwendung dieses Tests, das Vorliegen von 2 voneinander unabhängigen Stichproben, ist hier erfüllt. Bei dem U-Test handelt es sich um einen parameterfreien Rangordnungstest, bei dem die Kennzahl U angibt, wie häufig ein Beobachtungswert aus der Stichprobe n_2 einem solche aus n_1 in der Rangfolge vorausgeht.

Die Hypothese H_0 sagt aus, daß die vorliegenden Grundgesamtheiten eine gleiche Verteilung aufweisen. Die Alternativhypothese H_1 muß angenommen werden, wenn die Grundgesamtheit einer Gruppe, beispielsweise die Anzahl eines bestimmten Aberrationstyps in einer Azathioprin-Gruppe größer ist, als die der Vergleichsgruppe oder der Kontrollgruppe.

Die Berechnung der Prüfgröße U erfolgte nach der Gleichung:

$$U = n_1 \cdot n_2 + \frac{n_1 (n_2 + 1)}{2} - R_1$$

n_1 : Anzahl der Fälle aus Gruppe 1

n_2 : Anzahl der Fälle aus Gruppe 2

R_1 : Summe der Rangzahlen aus Gruppe 1

Die errechneten Werte U wurden mit den kritischen Werten U' aus einem Tabellenwerk verglichen (77). Zugrunde lag eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$.

3. Ergebnisse

3.1. In vivo Untersuchungen

Die Ergebnisse der Chromosomenanalyse sind aus den Tabellen 4 - 7 ersichtlich.

Werden Art und Häufigkeit der gefundenen Chromosomenschäden betrachtet, hebt sich keine der 4 untersuchten Gruppen hervor. Auch Patienten mit den höchsten kumulierten Azathioprin-Dosen zeigen das gleiche Aberrationsspektrum wie unbehandelte Personen oder solche, die Imurek^R nur in geringen Mengen eingenommen haben. Bei allen untersuchten Patienten und Kontrollpersonen wurden unspezifische Defekte (gaps), bei 75 % auch strukturelle Aberrationen, die auf Bruchereignisse zurückgeführt werden können, registriert.

In den 4 Personengruppen stellten unspezifische Defekte jeweils das größte Kontingent aller chromosomalen Veränderungen, wobei gaps etwa 20 mal häufiger auftraten als isogaps.

Offene Bruchstellen traten in weniger als 1 % aller untersuchten Zellen auf. Dabei waren acentrische Fragmente, also Brüche vom Chromosomentyp, insgesamt 5 mal häufiger als einfache Chromatidbrüche.

An Austauschaberrationen vom Chromosomentyp wurden nur 6 dicentrische Chromosomen, davon 3 bei den Imurek^R-behandelten Patienten (Gruppe 1), 2 bei der Kontrollgruppe (Gruppe 4) und eines bei einem unbehandelten Patienten (Gruppe 3) registriert. Lediglich eine chromatidale Austauschfigur wurde beobachtet, und zwar in der Gruppe der behandelten Patienten (Gruppe 1).

Tabelle 4: Ergebnisse der Chromosomenanalyse bei MS-Patienten unter Azathioprintherapie (Gruppe 1)

Patient	kumulierte Imurek-Dosis in g	ausgewertete Zellzahl	N-Zellen %	U-Zellen %	gaps pro Zelle	S-Zellen %	Aberrationen pro Zelle			
							Chromatid-brüche	acentrische Fragmente	dicentrische Chromosomen	chromatidale Austauschfiguren
A.G.	270	200	97.5	2.0	0.020	0.5	-	0.005	-	-
R.F.	171	200	93.0	7.0	0.070	-	-	-	-	-
I.E.	72	200	96.0	3.5	0.035	0.5	0.005	-	-	-
M.W.	59	200	96.5	3.5	0.035	-	-	-	-	-
A.W.	41	200	95.0	3.5	0.040	1.5	-	0.015	-	-
W.K.	36	200	95.0	4.5	0.045	0.5	-	0.005	-	-
E.F.	36	200	96.5	2.5	0.030	1.0	-	-	0.005	0.005
S.K.	5	200	94.0	5.5	0.055	0.5	-	-	0.005	-
J.H.	5	200	93.5	6.0	0.065	0.5	-	0.005	-	-
G.F.	2	200	95.5	4.0	0.040	0.5	-	-	0.005	-

Tabelle 5: Ergebnisse der Chromosomenanalyse bei MS-Patienten
im therapiefreien Intervall (Gruppe 2)

Patient	kumulierte Imurek- Dosis in g	behandelte Zellen	1-Zellen %	2-Zellen %	gaps pro Zelle	3-Zellen %	Aberrationen pro Zelle	
							chromosomische	acentrische Fragmente
1. A.	20	200	21,5	3,5	0,10	1,5	-	0,015
2. A.	20	200	21,0	3,5	0,085	1,5	-	0,015
3. A.	20	200	24,0	4,5	0,050	1,5	-	0,015
4. A.	20	200	26,0	3,5	0,080	1,0	0,010	-
5. A.	20	200	24,5	3,5	0,055	-	-	-
6. A.	20	200	26,0	4,0	0,040	-	-	-
7. A.	20	200	23,5	3,5	0,035	1,0	-	0,015
8. A.	20	200	26,5	3,5	0,030	0,5	-	0,015
9. A.	20	200	24,5	3,5	0,015	-	-	-
10. A.	20	200	24,5	3,5	0,025	1,0	0,010	0,015

Tabelle 6: Ergebnisse der Chromosomenanalyse bei unbehandelten MS-Patienten (Gruppe 3)

Patient	ausgewertete Zellzahl	N-Zellen %	U-Zellen %	gaps pro Zelle	S-Zellen %	Aberrationen pro Zelle		
						Chromatid- brüche	acentrische Fragmente	dicentrische Chromosomen
I.S.	200	94.0	5.0	0.050	1.0	-	0.010	-
I.M.	200	96.5	2.5	0.025	1.0	-	0.015	-
F.P.	200	95.0	4.5	0.045	0.5	-	0.005	-
I.I.	200	96.5	3.0	0.030	0.5	-	0.005	-
H.S.	200	96.5	3.5	0.035	-	-	-	-
W.S.	200	95.5	3.5	0.035	1.0	0.005	0.005	-
F.I.	200	96.0	3.5	0.035	0.5	-	0.005	-
L.T.	200	93.5	5.0	0.055	1.5	-	0.010	0.005

Tabelle 7: Ergebnisse der Chromosomenanalyse bei gesunden Kontroll-
personen (Gruppe 4)

Proband	ausgew. Zellzahl	N-Zellen %	U-Zellen %	gaps pro Zelle	S-Zellen %	Aberrationen pro Zelle			
						Chromatid- brüche	acentrische Fragmente	dicentrische Chromosomen	atypische Chromosomen
1147	200	97.5	1.5	0.015	1.0	-	0.010	-	-
1144	200	93.5	6.0	0.060	0.5	0.005	-	-	-
1033	200	98.5	1.0	0.010	0.5	0.005	-	-	-
1021	200	98.5	1.0	0.010	0.5	0.005	0.005	-	-
1030	200	99.5	0.5	0.005	-	-	-	-	-
974	200	92.5	7.0	0.070	0.5	-	0.005	-	-
968	200	98.5	1.0	0.010	0.5	-	-	0.005	-
933	200	99.0	1.0	0.010	-	-	-	-	-
910	200	93.5	3.0	0.030	1.5	0.010	-	0.005	-
1046 - 1157	1200	96.3	3.5	0.037	0.2	-	0.0008	-	0.0008

Die statistische Auswertung ergab, daß bei Patienten, die zur Zeit der Untersuchung oder früher Azathioprin einnahmen (Gruppen 1 und 2), die Anzahl der gaps und U-Zellen gegenüber der in der Kontrollgruppe signifikant ($p \leq 0,05$) erhöht war.

In der Gruppe der unbehandelten Patienten (Gruppe 3) waren signifikant ($p \leq 0,05$) mehr acentrische Fragmente als bei Imurekbehandelten Patienten (Gruppe 1) vorhanden.

Weitere Vergleiche der verschiedenen Personengruppen ergaben weder bei den einzelnen Zellkategorien noch bei den Aberrationstypen statistisch signifikante Unterschiede.

3.2. In vitro Untersuchungen

Nach Applikation der höchsten Azathioprin-Dosis ($400 \mu\text{g/ml}$) war in keinem Versuch eine detaillierte cytogenetische Beurteilung möglich. Mitosen waren zwar vorhanden, aber die Chromosomen präsentierten sich in einem teils hyper-, teils hypochromatischen Zustand. Andere Chromosomen waren entspiralisiert oder aufgequollen und zeigten "mottenfraßähnliche" Bilder. Aus den gleichen Gründen konnte auch die nächst niedere Konzentration von $100 \mu\text{g/ml}$ nur in Versuch 1 ausgewertet werden. Hier lag die gleiche Applikationsart wie bei den Vorversuchen zur Testung der cytotoxischen Dosis vor (G_0 -Exposition, für 3^h).

Die Ergebnisse der Chromosomenanalyse sind aus den Tabellen 8 - 11 ersichtlich.

Tabelle 8: Ergebnisse der Chromosomenanalyse
nach G₀-Applikation (Versuch 1)

AZT-Konzentration µg / ml	ausgewertete Zellzahl	N-Zellen %	U-Zellen %	gaps pro Zelle	S-Zellen %	acentrische Fragmente pro Zelle
100	200	96.0	3.50	0.035	0.5	0.005
40	200	94.0	5.00	0.050	1.0	0.010
4	200	95.0	4.50	0.045	0.5	0.005
2	200	94.5	5.50	0.060	-	-
1	200	95.0	4.50	0.045	0.5	0.005
-	300	97.0	2.66	0.030	-	-

Tabelle 9: Ergebnisse der Chromosomenanalyse
nach G₁/S-Applikation (Versuch 2)

AZT-Konzentration µg / ml	ausgewertete Zellzahl	N-Zellen %	U-Zellen %	gaps pro Zelle	S-Zellen %	acentrische Fragmente pro Zelle
40	200	95.5	4.0	0.040	0.5	0.005
4	200	95.0	4.5	0.045	0.5	0.005
2	200	98.5	1.0	0.010	0.5	0.005
1	200	96.0	4.0	0.040	-	-
-	300	97.0	3.0	0.030	-	-

Tabelle 10: Ergebnisse der Chromosomenanalyse
nach S/G₂ - Applikation (Versuch 3)

AZT-Konz. in µg/ml	ausgewert. Zellzahl	N-Zellen in %	U-Zellen in %	gaps pro Zelle	S-Zellen in %	Aberrationen pro Zelle	
						Chromatid-brüche	acentrische Fragmente
40	200	94.0	5.00	0.050	1.0	-	0.010
4	200	96.0	3.00	0.030	1.0	-	0.010
2	200	96.0	4.00	0.040	1	-	-
1	200	97.5	2.00	0.020	0.5	0.005	-
0	300	96.33	3.66	0.036	-	-	-

Tabelle 11: Ergebnisse der Chromosomenanalyse
nach G₂-Mitose-Applikation (Versuch 4)

AZT-Konz. in µg/ml	ausgewertete Zellzahl	N-Zellen in %	U-Zellen in %	gaps pro Zelle	S-Zellen in %	Aberrationen pro Zelle		
						acentrische Fragmente	dicentriche Chromosomen	atypische Chromosomen
40	200	91.0	8.0	0.085	1.0	0.020	-	-
4	200	94.5	4.5	0.045	1.0	0.010	-	-
2	200	92.0	6.5	0.070	1.5	0.033	0.010	-
1	200	88.0	11.0	0.115	1.0	0.010	-	-
0	300	94.33	5.0	0.055	0.66	0.033	-	0.033

Eine zellzyklusspezifische clastogene Wirkung von Azathioprin, die aufgrund der verschiedenen Applikationsformen am bevorzugten Auftreten chromosomaler bzw. chromatidaler Aberrationstypen zu erkennen wäre, war nicht vorhanden. Auch nach den Langzeitbehandlungen (24^h) in den Versuchen 2 und 3 traten keine vermehrten Chromosomenschäden auf.

Art und Zahl der beobachteten Chromosomendefekte aller in vitro Versuche entsprachen den Befunden nach in vivo Behandlung.

Bei unspezifischen Defekten fanden sich nur achromatische Lücken. Das Verhältnis gaps zu isogaps betrug wiederum ca. 20:1.

Strukturumbauten vom Chromosomentyp traten nur im Versuch 4, also nach G_2/M -Applikation, auf. Da hierbei im gleichen Präparat eine Zelle mit einem dicentrischen Chromosom und 2 identischen acentrischen Fragmenten, sowie eine Zelle mit einem dicentrischen Chromosom ohne Fragmente vorlag, handelt es sich wahrscheinlich um abgeleitete ("derived") Aberrationen vom Chromosomentyp, die in Zellen beobachtet werden, die bereits ihre 2. in vitro Teilung vollziehen. Bei offenen Brüchen kamen acentrische Fragmente und einfache Chromatidbrüche im Verhältnis 20:1 vor.

In keinem der vier Experimente ergab sich ein Hinweis auf eine Dosisabhängigkeit der beobachteten Chromosomenaberrationen. Signifikante Unterschiede gegenüber den Kontrollen traten nicht auf.

4. Diskussion

Bereits in der Einleitung wurde kurz auf die in der Literatur vorliegenden widersprüchlichen Aussagen über mutagene Effekte von Azathioprin hingewiesen. Getrennt nach den verschiedenen Testsystemen soll im folgenden Abschnitt zunächst nach den Ursachen der unterschiedlichen Befunde gesucht werden, um dann Beurteilungskriterien aufzustellen, die begründete Aussagen über eine cytogenetische Wirkung zulassen. Anhand dieser Kriterien werden sowohl die bisherigen, als auch die eigenen Befunde überprüft, um so zu einer abschließenden Bewertung über clastogene Effekte von Azathioprin zu gelangen.

4.1. Chromosomenanalyse in vivo

In den meisten bisherigen Veröffentlichungen wurden Befunde an Azathioprin-behandelten Patienten erhoben, wobei periphere Lymphozyten und Zellen aus dem Knochenmark untersucht wurden. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden hier beide Zellsysteme getrennt behandelt.

4.1.1. Untersuchungen an peripheren Lymphozyten

Der Vorteil gegenüber Knochenmarksanalysen liegt in der geringen Belastung des Patienten bei der Gewinnung des Untersuchungsguts und in der einfacheren Labortechnik. Deshalb bevorzugten auch die meisten Autoren Lymphozytenkulturen.

Die einzelnen Untersuchungen variieren allerdings in einer Reihe von Punkten.

In Tabelle 12 sind die cytogenetischen Befunde zusammengefaßt.

Patientenzahl

Zunächst erfordert eine sinnvolle statistische Analyse beim Vergleich mit einer Kontrollgruppe eine bestimmte Mindestgröße des Untersuchungskollektivs. Einige Autoren (41, 74) wiesen auf beträchtliche Schwankungen der Aberrationsraten bei Patienten mit vergleichbarer Behandlung hin. Dies wurde mit einer individuell unterschiedlichen Empfindlichkeit auf Azathioprin begründet. Auch in Veröffentlichungen, in denen nicht explicit auf dieses Phänomen hingewiesen wurde, sind interindividuelle Unterschiede in den Aberrationsraten zu finden.

Nur durch entsprechend umfangreiche Untersuchungsgruppen läßt sich ein Fehler durch zufällig ungünstige Auswahl einzelner Probanden vermeiden. Eine Untersuchungsgruppe mit mindestens 5 Probanden wird als untere Grenze angesehen. Kleinere Kollektive wurden jedoch von JENSEN (1967), KUCEROVA (1976) und VORMITTAG (1974, nur 1 Kontrollperson) untersucht.

Begleitende Therapie und Grundkrankheit

Alle Autoren wiesen darauf hin, keine Patienten oder Kontrollpersonen untersucht zu haben, die therapeutisch bestrahlt oder anderweitig cytostatisch behandelt waren.

Die meisten Patienten erhielten im Rahmen der immunsuppressiven Therapie zusätzlich Kortikosteroidpräparate - Prednison^R oder Prednisolon^R -, von denen bisher keine chromosomenschädigende Wirkung bekanntgeworden ist. In einzelnen Fällen lag bei MS-Patienten eine zusätzliche Behandlung mit Ductus-Thoracicus-Drainage und/oder Antilymphozytenglobulin vor, die nachweislich (5) cytogenetisch ohne Bedeutung ist.

Tabelle 12: Vergleich der bisherigen cytogenetischen Befunde von Zellen mit strukturellen Chromosomendefekten

Autor	Zahl der untersuchten Patienten	Zahl der untersuchten Kontrollen	mittlere Zahl der auswerteten Zellen	Kulturzeit (h)	S-Zellen %	
					vor Therapie	unter Therapie
JENSEN (1967)	4	4	50	72	2.0	4.5
GANNER (1973)	23	18	100	72	-	2.6
	23	10	100	72	-	2.6
FRIEDRICH (1970)	19	30	50	48	-	2.5
	7	7	50	48	1.8	2.5
UNGLAUB-LEISTEN (1975)	22	12	100	68	-	8.5
	22	10	100	68	-	8.5
KUCEROVA (1976)	4 ¹⁾	10	200	56	-	9.0
	4 ²⁾	10	200	56	-	1.5
EBERLE (1968)	15	15	80	72	0.13	0.11
SCHINZEL (1976)	11	10	100	72	-	0.3
VORMITTAG (1974)	5	1	50	72	4.0 ³⁾	6.6 ³⁾
eigene Befunde	10	10	200	48	-	0.55
	10	8	200	48	-	0.55

1) Therapie kürzer als 2 Jahre

2) Therapie länger als 3 Jahre

3) alle Aberrationstypen, einschließlich numerischer

in Lymphozyten bezogen auf die Häufigkeit
(S-Zellen)

S-Zellen %		Bewertung der Autoren
unbehandelte Patienten	Kontrollen	
-	-	Keine Bewertung
-	1.0	Bei Behandelten signifik. erhöht, bei Urämikern signifik. erhöht gegenüber Behandelten
5.9	-	
-	0.2	Bei Behandelten signifik. erhöht gegenüber Kontrollen, keine Signifikanz im Verlauf der Therapie
-	-	
-	4.6	Bei Behandelten signifik. erhöht zu Kontrollen und Unbehandelten, bei Unbehandelten signifik. erhöht zu Gesunden
6.0	-	
-	0.5	Bei Langzeitbehandelten signifik. erhöht, kein Unterschied bei Kurzzeit- und Unbehandelten
-	0.5	
-	-	Kein Unterschied im Verlauf der Therapie
-	0.5	Kein Unterschied Behandelte zu Gesunden
-	-	Fragliche Signifikanz, da 1 Fall mit sehr hohen Aberrationen
-	0.52	Kein Unterschied Behandelte zu Kontrollen sowie zwischen Unbehandelten und Gesunden
0.75	-	

Ungeklärt dagegen ist bisher der Einfluß einiger Krankheiten, die immunsuppressiv behandelt werden. Über erhöhte Aberrationsraten wurde bei chronischen Hepatiden (2, 6, 18, 48 - 50), bei Patienten mit urämischer Stoffwechsellage (23, 24) und bei MS-Patienten (21, 36, 38, 72) berichtet. Bei MS-Patienten fanden WRIGHT und BATES (1973) keine erhöhten Aberrationsraten.

Eine detaillierte Bewertung dieser unterschiedlichen Befunde kann nicht vorgenommen werden, da die meisten der zitierten Arbeiten zu geringe Zell- und Patientenzahlen enthalten, die gefundenen Aberrationen zum großen Teil numerische Defekte sind und zudem einige der Patienten doch cytostatisch behandelt waren. Der "Störfaktor Grundkrankheit" muß im folgenden dennoch berücksichtigt werden, da ihm in der Beurteilung von Chromosomenschäden immunsuppressiv behandelter Patienten eine Bedeutung zukommt.

Kontrollgruppen

Eine wesentliche Voraussetzung für die Mutagenitätstestung stellen vergleichbare Kontroll-Kollektive dar. Zusätzliche Bedeutung kommt den Kontrollen durch den möglichen Einfluß der Grundkrankheit an der clastogenen Wirkung zu. Eine eindeutige Aussage über die Mutagenität eines Stoffes ist nur dann möglich, wenn ein schädigender Effekt der Grundkrankheit ausgeschlossen ist.

Folgende Möglichkeiten der Auswahl von Kontrollgruppen liegen vor:

1. Mit der Testsubstanz zu behandelnde Patienten werden vor Therapiebeginn cytogenetisch untersucht. Vorteil dieser Methode ist der Ausschluß möglicher Einflüsse durch die Grundkrankheit.

Eine Beobachtung von Effekten, die durch große Mengen des eingenommenen Medikaments verursacht werden, kann mit dieser Methode nicht erfaßt werden, es sei denn, diese Studie läuft über mehrere Jahre.

In den meisten Untersuchungen (17, 31, 47, 69, 75) wurde dieses Verfahren angewandt, wobei aber z.B. von VORMITTAG (1974) nur ein Patient als Kontrolle vor Therapiebeginn untersucht wurde.

2. Als Kontrolle dienen gesunde Versuchspersonen mit einem zu den Patienten vergleichbarem Alter. Vorteil dieses Verfahrens ist, daß auch Patienten miteinbezogen werden können, die über mehrere Jahre hinweg das Agens eingenommen haben, also mögliche Langzeiteffekte erfaßt werden können. Nicht berücksichtigt wird bei Anwendung dieses Verfahrens eine mögliche Mitbeteiligung der zugrunde liegenden Krankheit. In 2 Publikationen, die sich mit Azathioprin befaßten (40, 65), kam dieses Verfahren zur Anwendung.

3. Durch Einbeziehung einer weiteren Kontrollgruppe, bestehend aus Patienten, die an der gleichen Krankheit leiden, aber unbehandelt untersucht werden, kann der Nachteil des obigen Verfahrens ausgeglichen werden. Dieses Verfahren erscheint als das beste und wurde von 3 Arbeitsgruppen (23, 24, 72), sowie in der vorliegenden Untersuchung angewandt.

Darüber hinaus existieren noch Publikationen (25, 39, 63), in denen keinerlei Vergleiche mit Kontrollen durchgeführt wurden. In der weiteren Diskussion finden diese Arbeiten keine Berücksichtigung.

Statistische Auswertung

Von den meisten Autoren (17, 24, 30 - 33, 40, 41) wurde zur statistischen Bewertung der Daten der χ^2 -Test, in 2 Arbeiten (23, 75) der T-Test benutzt. Für cytogene-tische Untersuchungen können diese beiden Testverfah-ren aber nur verwendet werden, wenn es sich um gleiche Grundgesamtheiten handelt, wie etwa Untersuchungen in vitro mit dem selben Spenderblut.

Für in vivo Untersuchungen kann nur ein parameterfreier Rangordnungstest, wie z.B. der MANN-WHITNEY-Test in der vorliegenden Untersuchung, Anwendung finden, der von der Grundgesamtheit unabhängig ist.

Bei den verbliebenen Publikationen (25, 39, 47, 63, 65, 69, 72) wurde entweder auf eine statistische Aufarbei-tung verzichtet, oder die benutzte Methode nicht mitge-teilt.

Kulturzeit

Die Chromosomenanalysen wurden von den einzelnen Ar-beitsgruppen nach unterschiedlichen Kulturbedingungen erhoben. Ein wesentlicher Faktor ist hierbei die Kul-turzeit. Am häufigsten wurden 72^h -Kulturen benutzt (17, 24, 31, 65, 75). UNGLAUB-LEISTEN et al. (1975) und KUCEROVA (1976) geben eine Kulturdauer von 56 bzw. 68 Stunden an. 48 Stunden wurden die Zellen von FRIED-RICH und ZEUTHEN (1970), 24 bis 48 Stunden die von ROSSI und Mitarb. (1973) kultiviert. Die Kulturzeit in der vorliegenden Studie betrug 48 Stunden.

Dies ist die Zeit, in der die meisten PHA-stimulierten kleinen Lymphozyten die erste Zellteilung (X_1 -Zellen) im Ansatz vollenden können. Nach 72 Stunden befindet sich ein großer Teil der Zellen in der 2. oder 3. Tei-

lungsphase (X_2 -, X_3 -Zellen). Erfasst man bei der Chromosomenanalyse überwiegend X_2 -Zellen, kann das zu Fehlinterpretationen der ursprünglichen Aberration führen. So können beispielsweise in X_2 -Zellen Aberrationen als Strukturumbauten vom Chromosomentyp erfasst werden, die bei Beobachtung in X_1 -Zellen als einfache Chromatidbrüche zu bewerten wären (siehe z.B. Kapitel 3.2. der vorliegenden Studie). Es handelt sich dann um sog. "derived aberrations". Andererseits können letale Chromosomendefekte aus dem 1. Zellzyklus im folgenden nicht mehr beobachtet werden, weil die Zelle mittlerweile untergegangen ist.

Ein Vergleich des Aberrationsspektrums aus Arbeiten mit unterschiedlichen Kulturzeiten ist somit nur mit Einschränkung möglich.

Ausgewertete Zellzahl

Die Zahl der analysierten Zellen erscheint als einer der wichtigsten Parameter bei der vergleichenden Beurteilung bisheriger Befunde.

Falls dem Azathioprin tatsächlich eine clastogene Wirkung zukommen sollte, so sicher nur eine sehr schwache. Darin sind sich die meisten Autoren einig. Um aber unter diesen Umständen zufällige Schwankungen in der spontanen Aberrationsrate sicher von tatsächlichen Effekten abgrenzen zu können, müssen entsprechend hohe Zellzahlen analysiert werden.

Neben den eigenen Experimenten (200 Zellen) wurden nur von 4 weiteren Autoren (24, 40, 65, 72) im Mittel 100 oder mehr Zellen pro Fall untersucht, eine Zahl, die bei der gegebenen Potenz des fraglichen Mutagens als untere Grenze angesehen werden muß.

Cytogenetische Befunde

Soweit in den vorliegenden Publikationen die Anzahl der beobachteten gaps angegeben ist, zeigt sich, daß dieser Störungstyp am häufigsten auftritt. Strukturelle Chromosomenaberrationen kommen in weitaus geringerer Anzahl vor, überwiegend in Form offener Brüche, wie Chromatiddeletionen und acentrische Fragmente. Strukturumbauten, wie dicentrische Chromosomen, symmetrische Translokationen, Ringe und Chromatidaustauschprozesse werden nur selten beobachtet.

Die Klassifikation der beobachteten Chromosomendefekte stellt die größte Schwierigkeit bei der Beurteilung bisheriger Befunde dar. Ein Teil der Publikationen enthält exakte Aufschlüsselungen der verschiedenen Aberrationstypen, in einem anderen Teil sind gaps und Brüche zusammengefaßt. Teilweise werden auch noch numerische Abweichungen miteinbezogen.

Die quantitative Aufarbeitung reicht von Angaben der Rate geschädigter Chromosomen bezogen auf die Zahl insgesamt analysierter Chromosomen, über die Zahl geschädigter Chromosomen pro Einzelzelle, bis zur prozentualen Häufigkeit einzelner Defekte bzw. geschädigter Zellen. Einige Autoren verzichteten ganz auf Zellenangaben.

Zu Vergleichszwecken wurde deshalb für die verschiedenen Befunde als Referenzwert der Prozentsatz von jenen Zellen ausgewählt, die strukturelle Chromosomenaberrationen, die auf Bruchereignisse zurückzuführen sind, enthielten. Diese sind nach dem von BAUCHINGER und HUG (1966) angegebenen Schema als S-Zellen zu klassifizieren. Dieser Zelltyp wurde ausgewählt, weil

1. dieser Wert aus den meisten Veröffentlichungen errechnet werden konnte,

2. die Zahl ausgewerteter Zellen nicht berücksichtigt werden mußte,
3. bei unterschiedlichen Kulturzeiten zwischen verschiedenen Defekten (z.B. derived aberrations) nicht unterschieden werden muß.

Eine vergleichende Aufstellung der z.T. neu errechneten Werte zeigt Tabelle 12. Wo keine Differenzierung möglich war, ist dies in der Tabelle vermerkt.

Auf eine ähnliche Bewertung von gaps wurde verzichtet, da in vielen Arbeiten genaue Angaben über ihre Häufigkeit fehlen, und zudem gaps keine echten Diskontinuitäten der Chromosomenstruktur darstellen. Da aber gaps gerade bei Einwirkung chemischer Mutagene vermehrt auftreten können, ist ihre Registrierung zu empfehlen. Es ist jedoch zweckmäßig, sie von strukturellen Chromosomenaberrationen zu trennen, insbesondere solange ihre Bedeutung für das Mutationsgeschehen nicht geklärt ist.

Ebenso blieben numerische Aberrationen unberücksichtigt. Polyploidien wurden so gut wie nie beobachtet, geringe Abweichungen von der normalen Chromosomenzahl sind wohl eher als präparationsbedingte Artefakte und nicht als Folge von Verteilungsstörungen anzusehen.

Betrachtet man die bisherigen Befunde unter diesen Aspekten, so fällt auf:

1. Der Prozentsatz an S-Zellen in den Gruppen der gesunden Versuchspersonen schwankt erheblich und liegt zwischen 0,2 und 4,6 %. Dies ist sicher auf die angesprochenen unterschiedlichen Kulturbedingungen und Bewertungskriterien zurückzuführen. In 2 Veröffentlichungen (72, 75) wird - noch unter Verwendung konventioneller Färbetechniken - eine intrachromosomale Verteilung von Brüchen und gaps angegeben.

Hierbei fällt auf, daß viele gaps und Brüche an Chromosomenabschnitten auftreten, an denen Sekundäreinschnürungen zu finden sind. Dies sind normale Chromosomenstrukturen, die u.U. mit gaps verwechselt werden können. Darüber hinaus ist zu bemerken, daß die Gesamtzahl der beobachteten Effekte für eine stringente statistische Analyse der Verteilung sicher zu gering ist.

2. Die Kontrollgruppe unbehandelter Patienten mit Krankheiten fraglicher cytogenetischer Relevanz weist in allen Untersuchungen eine höhere Aberrationsrate auf als die Kontrollgruppe gesunder Probanden. Allerdings ist dies nicht in jedem Fall statistisch belegt.

3. Je weniger Zellen pro untersuchtem Einzelfall ausgewertet wurden, umso größer ist die Diskrepanz zwischen Behandelten und Kontrollen.

Beurteilungskriterien für clastogene Wirkung

Nach den bisherigen Ausführungen sind für die Beurteilung clastogener Effekte chemischer Substanzen in vivo folgende Kriterien besonders zu beachten:

Zu einem objektiven Vergleich müssen quantitativ und qualitativ ausgewogene Gruppen von Patienten und Kontrollpersonen ausgewählt werden.

Die Kulturzeit der Lymphozyten sollte so gewählt werden, daß der größte Teil der Zellen in der 1. Zellteilungsphase in vitro beobachtet werden kann.

Die Anzahl ausgewerteter Zellen sollte mindestens 200 pro untersuchten Einzelfall betragen. Dies ergibt sich aus den Aberrationshäufigkeiten in den Kontrollen.

Die Chromosomenanalyse muß zu einer eindeutigen Klassifizierung der cytogenetischen Effekte führen.

Unterzieht man die bisherigen Veröffentlichungen über die clastogene Wirkung von Azathioprin einer kritischen Prüfung anhand der aufgestellten Kriterien, so müssen die einzelnen Aussagen unterschiedlich gewichtet werden.

Aufgrund fehlender Zahlenangaben oder fehlender Kontrollen scheiden aus der Diskussion 4 Veröffentlichungen mit negativen Befunden (25, 47, 63, 69), sowie eine mit positivem Befund (39), aus.

Mit Einschränkung können nur eine Reihe von Veröffentlichungen (17, 23, 31, 75) aufgrund obiger Kriterien bewertet werden, da weniger als 100 Zellen pro Fall ausgewertet wurden. Mit Zurückhaltung wird die Veröffentlichung von KUCEROVA (1976) bewertet, die bei Langzeitbehandelten eine signifikant erhöhte Bruchrate gegenüber Kurzzeitbehandelten fand. Abgesehen von den zu kleinen Untersuchungsgruppen - jeweils 4 Patienten - befindet sich ein nur kurze Zeit behandelter Patient mit hohen Aberrationsraten in der Gruppe der Langzeitexponierten. Aufgrund der kumulierten Azathioprin-Dosis der einzelnen Patienten, erscheint die Einteilung in Patientengruppen mit kurzer und langer Einnahmedauer nicht gerechtfertigt. Eine dosisabhängige Wirkung, wie sie von der Autorin postuliert wird, erfordert zudem eine exakte mathematische Analyse, die in dieser Veröffentlichung fehlt.

FRIEDRICH und ZEUTHEN (1970) fanden zwar erhöhte Aberrationsraten bei Azathioprin-behandelten Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden, jedoch keine Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Patienten. Diese Autoren erklären ihre Befunde mit einem nicht auszuschließenden Effekt seitens der zugrundeliegenden urämischen Stoffwechsellaage.

Nicht festlegen, hinsichtlich einer Aussage über eine mutagene Wirkung von Azathioprin, konnte sich VORMITTAG (1974), da bei seinen Untersuchungen ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle, nur unter Einbeziehung eines Patienten mit abnorm hohen Raten, vorlag.

Keine Aussage zur Mutagenität von Azathioprin machte JENSEN (1967), in dessen Untersuchung 2 Patienten mit erhöhten Bruchraten 2 Patienten gegenüberstanden, die im Verlauf der Therapie unveränderte Befunde zeigten.

Von diesen mit Einschränkung zu bewertenden Veröffentlichungen spricht sich lediglich EBERLE und Mitarb. (1968) gegen eine mutagene Wirkung von Azathioprin aus.

Die in der Diskussion verbliebenen Arbeiten mit eindeutig positiven Befunden (24, 72), schließen einen möglichen clastogenen Effekt durch die Grundkrankheit nicht aus, da in beiden Fällen die Aberrationsrate unbehandelter Patienten gegenüber der Rate Gesunder signifikant erhöht war.

Eine weitere Publikation (65), die den Beurteilungskriterien genügte, und in der negative Befunde erhoben wurden, basiert ebenfalls auf Patienten mit einer fraglich cytogenetisch relevanten Erkrankung. In den eigenen Untersuchungen war kein signifikanter Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Patienten, sowie zwischen Patienten und gesunden Probanden nachweisbar.

Trotz dieser, bei in vivo Untersuchungen erhobenen widersprüchlichen Befunden, sowie aufgrund der eigenen Ergebnisse, erscheint die Aussage berechtigt, daß Azathioprin alleine keinen clastogenen Effekt in peripheren Lymphozyten bewirkt. Auch positive Befunde sind durchaus in dieser Hinsicht zu interpretieren, da über-

wiegend gaps beobachtet wurden und strukturelle Veränderungen, die auf eine Diskontinuität zurückgehen, nur selten und in geringer Zahl auftraten.

4.1.2. Untersuchungen an Knochenmarkszellen

Chromosomenanalysen aus dem Knochenmark Azathioprin-behandelter Patienten und von Kontrollpersonen wurden von 3 Arbeitsgruppen (24, 30 - 33, 47) durchgeführt. Von der Veröffentlichung von MARKOVIC et al. (1970) stand nur eine englische Zusammenfassung zur Verfügung, aus der genauere Angaben nicht zu entnehmen waren. Daher wurde diese Untersuchung, die keine erhöhten Aberrationen bei Azathioprintherapie erbrachte, in die allgemeine Bewertung nicht miteinbezogen.

Kontrollen

In allen Untersuchungen standen nicht bestrahlte oder cytostatisch behandelte Patienten zur Verfügung. Bei GANNER und Mitarb. (1973) handelt es sich allerdings um 5 "controls hospitalized for cytogenetically irrelevant diseases" ohne nähere Angaben.

Zellzahl

In allen Untersuchungen wurden nur 50 Metaphasen pro Fall ausgewertet.

Cytogenetische Befunde

JENSEN (1966, 1967, 1970, 1976) berücksichtigt nur strukturelle Chromosomendefekte. In allen Untersuchungen tritt ein ähnliches Aberrationsspektrum wie bei den Befunden der Lymphozyten auf, d.h. offene Brüche überwiegen. Tabelle 13 zeigt den Vergleich der cytogene-

Tabelle 13: Vergleich der bisherigen cytogenetischen Befunde in Knochenmarkszellen bezogen auf die Häufigkeit von Zellen mit strukturellen Chromosomendefekten (S-Zellen)

Autor	Zahl der unter- suchten Patienten	Zahl der unter- suchten Kontrollen	ausgewertete Zellzahl	S-Zellen %			Aussage des Autors
				Vor Therapie	unter Therapie	Kontrollen	
JENSEN (1966)	5	5	50	1.6	10.0	-	Signifikante Erhöhung im Verlauf der Thera- pie und im Vergleich zu Kontrollen
JENSEN (1967)	6	6	50	1.6	7.6	-	
JENSEN (1970)	6	5	50	-	7.6	1.4	
	15	6	50	-	8.8	1.4	
GANNER (1973)	8	5	50	-	1.0	1.0	Kein Unterschied Behandelter zu Gesunden

tischen Befunde bezogen auf die prozentuale Häufigkeit der S-Zellen.

Eine interindividuelle Variabilität im Ansprechen auf Azathioprin kann auch in den Knochenmarkszellen beobachtet werden.

Insgesamt liegen bei den Knochenmarksbefunden die Aberrationsraten höher als bei Lymphozyten. Ob das Knochenmark ein empfindliches Testsystem darstellt, wie JENSEN behauptet, kann aufgrund der geringen Zahl analysierter Zellen nicht beurteilt werden. Zudem benutzten auch weniger Arbeitsgruppen dieses Testsystem.

Die Bewertung der Knochenmarksbefunde hinsichtlich einer statistisch signifikanten clastogenen Wirkung von Azathioprin ist nur bedingt möglich, weil in den Untersuchungen zu geringe Zellzahlen ausgewertet wurden, und nur sehr wenige Patienten erfaßt wurden. Bei GANNER et al. (1973) ist die Relevanz der Kontrollgruppe fraglich, und bei 2 Veröffentlichungen von JENSEN (1966 und 1970) wiesen nur 2 von 5 Patienten, bzw. 10 von 15 Patienten vermehrt Chromosomendefekte auf.

4.2. Chromosomenanalysen in vitro

Die Beantwortung der Frage nach einer clastogenen Wirkung von Azathioprin in vitro setzt voraus, daß die Substanz ihre pharmakologische Wirkung auch in einem extrakorporalen Testsystem entfalten kann.

Die aktive Form des Azathioprin stellt ein 6-Mercaptopurin dar. Aus galenischen Gründen, vor allem zur Aufrechterhaltung langwirkender und gleichmäßiger Blutspiegel, wurde das Purin über eine Thioätherbrücke mit einem Methyl-Nitro-Imidazolring verbunden. Dieses Molekül wird Azathioprin genannt. Im Organismus muß dieser

Stoff erst gespalten werden, um die pharmakologisch wirksame Gruppe freizusetzen. Bei den meisten Medikamenten findet eine solche Umwandlung durch in der Leber vorhandene Enzymsysteme statt. Würde diese "Giftung" auch beim Azathioprin in diesem Organ vor sich gehen, müßte man z.B. Lebermikrosomenfraktionen dem Versuchsansatz zufügen.

BOLL und Mitarb. (1971) konnten durch vergleichende Experimente mit Azathioprin und 6-Mercapto-Purin nachweisen, daß im in vitro System ohne Beteiligung der Leber beide Cytostatika wirksam sind.

Den chemischen Vorgang klärten BÄR und Mitarb. (1973) auf, wobei sie beweisen konnten, daß die "Giftung" des Azathioprins nicht enzymatisch katalysiert wird. Die Thioätherbrücke wird durch einen nucleophilen Angriff von Sulfhydrylgruppen tragenden Verbindungen gespalten, bei dem 6-Mercapto-Purin freigesetzt, und der Imidazolring kovalent gebunden wird.

Im peripheren Blut sind genügend hohe Konzentrationen derartiger spaltender Verbindungen gelöst, die auch im isolierten in vitro System eine Freisetzung der aktiven Form von Azathioprin gewährleisten. Eine herausragende Rolle spielt bei diesem Vorgang das Tripeptid Glutathion (Glu-Cys-Gly), das vor allem in Erythrozyten angereichert ist.

Mittels C^{14} -markiertem Azathioprin konnte nachgewiesen werden, daß sich innerhalb von 20 Minuten nach in vitro Applikation ausgeglichene Spiegel intra- und extrazellulär einstellen (14). Diese Befunde sind für die vorliegende Arbeit wichtig, da einerseits Chromosomen als intrazelluläre Strukturen untersucht werden, andererseits bisher die Zellelemente, an denen Azathioprin angreift, nicht eindeutig bekannt sind.

Ein Vergleich der bisherigen in vitro Befunde mit kleinen Lymphozyten ist schwierig, da vielfach verschiedene Applikationsweisen und Dosierungen sowie unterschiedlich lange Kulturzeiten zugrundeliegen. Trotzdem soll auch in diesem Abschnitt versucht werden, Beurteilungskriterien zu finden, anhand derer eine Aussage über die cytogenetische Wirkung von Azathioprin möglich ist.

Kulturzeit

Den 4 bereits publizierten Untersuchungen (28, 41, 55, 74), liegen 72^h -Kulturen, den eigenen Experimenten 48^h -Kulturen zugrunde. Auf den Einfluß der Kulturzeit für die Chromosomenanalyse wurde bereits in Teil 4.1. hingewiesen. Die Ausführungen gelten analog für in vitro Untersuchungen, insbesondere dann, wenn Aussagen über eine zellzyklusspezifische Wirkung gemacht werden sollen.

Applikationszeit

Nach den Versuchen zur "Giftung" von Azathioprin von DE MIRANDA et al. (1973), kann die aktive Form von Azathioprin 20 Minuten nach Applikation wirken. Daher ist eine Einwirkungsdauer von mindestens einer Stunde zu fordern. Sollen bei dieser kurzen Einwirkungszeit, wie von VAN ZYL und WISSMÜLLER (1974), Versuche zur Zellzyklusspezifität unternommen werden, so erscheint diese Zeit zu kurz, da die Zellen sicher nicht so synchron wachsen, daß sich alle gerade in einer spezifischen Phase befinden. Dies gilt insbesondere bei einer 72^h -Kultur für die letzten 24 Stunden (siehe auch 4.1.).

Die meisten Autoren applizierten Azathioprin nur während der letzten 24 Stunden. Um eine eventuell vorhandene zeitabhängige Wirkung beobachten zu können, sollten auch kürzere Applikationszeiten untersucht

werden. Einen solchen Effekt konnten VAN ZYL und WISS-MÜLLER auch tatsächlich nachweisen. Sie beobachteten die höchste Anzahl gestörter Zellen bei Applikation während der letzten 12 Stunden, allerdings nur bei hohen Konzentrationen ($16,6 \times 10^{-5}$ Mol/l). Eine mathematisch-statistische Analyse wurde aber nicht vorgenommen. Die eigenen Ergebnisse konnten diese Befunde nicht bestätigen (siehe 2.2., Versuch 3 und 4).

Applikationsart

Da Imurek^R im allgemeinen in Tablettenform angewandt wird, ergibt sich die Schwierigkeit, eine vorwiegend lipoidlösliche Trockensubstanz in eine wässrige Kulturlösung einzubringen. HAMPEL und Mitarb. (1971) lösten Azathioprin in verschiedenen Lösungsmitteln, die, wie anhand von Kontrollversuchen ersichtlich, auch ihrerseits die Zellen schädigten. So war die Rate von Zellen mit Chromosomendefekten nach alleiniger Oximazon- und Butanolapplikation nur geringfügig kleiner, als nach Behandlung mit Azathioprin in einem dieser Lösungsvermittler. Azathioprin in wässriger Lösung erhöhte bei HAMPEL die Aberrationsraten nicht.

Die anderen Autoren gaben nicht an, wie sie Azathioprin verabreichten. Es wird jedoch angenommen, daß sie, wie in der vorliegenden Studie, Imurek pro injectione^R verwendeten, das durch eine geringfügige Veränderung der Molekülstruktur wasserlöslich ist.

Applikationsdosis

Im Gegensatz zu den in vivo Untersuchungen, bei denen annähernd gleiche Blutspiegel herrschen, ist bei den Versuchen im extrakorporalen Testsystem die Möglichkeit gegeben, höchste Dosen zu testen, um eine frag-

liche Mutagenität durch Potenzierung der Dosen zu verdeutlichen. Diesen Weg gingen alle Autoren außer KUCEROVA und POLIVKOVA (1977). In dieser Untersuchung ist der gewählte Konzentrationsbereich von 0,001 bis 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ unverständlich, weil er noch unter dem mittleren therapeutischen Blutspiegel bei behandelten Patienten liegt. Dieser Wert wird nach eingehenden Untersuchungen (20) mit 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ angegeben. Andererseits wurden von HAMPEL und Mitarb. (1971) und von VAN ZYL und WISSMÜLLER (1974) nur Konzentrationen untersucht, die weit über diesem Bereich liegen. Daher ist es zunächst nicht überraschend, wenn diese Autoren positive Befunde im Sinne erhöhter Aberrationsraten erheben, KUCEROVA und POLIVKOVA (1977) jedoch negative.

OBE (1971) untersuchte Konzentrationen von 0,005 bis 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, und fand nur im höchsten Dosisbereich (25-fache therapeutische Konzentration) einen Anstieg an geschädigten Zellen im Vergleich zum Leerwert. In den eigenen Versuchen wurde weder im therapeutischen Bereich, noch in höherer Dosierung eine erhöhte Aberrationsrate festgestellt.

HAMPEL und Mitarb. (1971) stellten in ihrer Untersuchung eine dosisabhängige clastogene Wirkung von Azathioprin fest. Es wurden allerdings nur 4 Konzentrationen von 5 bis 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ getestet und die Dosis-Wirkungsbeziehung nur graphisch dargestellt. Eine statistische Behandlung der Daten liegt nicht vor. In der vorliegenden Untersuchung wurde weder in den therapeutischen noch in den darüberliegenden Konzentrationen erhöhte Aberrationsraten beobachtet.

Da nach ELION (1972) das pharmakologisch wirksame Spaltprodukt des Azathioprins, nämlich 6-Mercapto-Purin, sehr konstante Blutspiegel von 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aufweist, ist es generell fraglich, ob auch in vitro

höhere Konzentrationen des aktiven Teils überhaupt erreicht werden. Die eigenen Versuche können diese Annahme bestätigen, da im untersuchten Dosisbereich von 1 - 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ keine Unterschiede im Aberrationsspektrum beobachtet werden konnten.

Ausgewertete Zellzahl

Von allen Autoren wurden mindestens 100 Zellen ausgewertet. Dies ist als untere Grenze zu fordern. Da jedoch bei in vitro Versuchen in der Regel nur eine Analyse pro untersuchte Konzentration oder Applikationsart erfolgt, wäre eine höhere Zellzahl zu empfehlen.

Cytogenetische Befunde

Das Aberrationsspektrum entspricht weitgehend dem bei in vivo Untersuchungen. Gaps traten am häufigsten auf. Lediglich HAMPEL und Mitarb. (1971) beobachteten sie nur gelegentlich. Bei strukturellen Chromosomendefekten überwiegen offene Brüche, Strukturumbauten sind selten.

Zellzyklusspezifität

VAN ZYL und WISSMÜLLER (1974) berichten über eine erhöhte Aberrationsrate nach Azathioprin-Applikation während der S-Phase. Auffallend erhöht war die Anzahl geschädigter Zellen, wenn bei 72-stündiger Kulturzeit Azathioprin während der letzten 24 Stunden zugesetzt worden war, und zwar sowohl kontinuierlich in den letzten 3, 6, 12, 18 und 24 Stunden, als auch kurzzeitig für jeweils eine Stunde mit nachfolgender Auswaschung in diesem Zeitraum.

Die Annahme der Autoren, daß bei dieser Applikationsart speziell die S-Phase erfaßt würde, ist sicher nicht gerechtfertigt, da in bisherigen Untersuchungen zur

Zellkinetik peripherer Lymphozyten der Beginn der S-Phase etwa 24 Stunden nach PHA-Stimulation (16, 61) eintritt, und die Dauer mit ca. 10 Stunden (12, 81) angegeben wird.

Da nicht alle Lymphozyten synchron wachsen, kann nicht ohne weiteres davon ausgegangen werden, daß bei der beschriebenen Versuchsanordnung die in der Metaphase analysierten Zellen tatsächlich nur in der S-Phase dem Azathioprin exponiert waren. Bei einer 48-Stunden-Kultur ist diese Annahme sicherer, da hier die Möglichkeit einer Zelle, sich zweimal zu teilen, weit geringer ist. Aber auch unter diesen Bedingungen liegt keine Synchronität im Zellwachstum vor.

Cytotoxische Effekte

Unter Cytotoxizität ist hier ein konzentrationsabhängiges Sistieren der Mitose-tätigkeit zu verstehen.

Die Grenzkonzentration, bei der gerade noch Zellen in die Mitosephase kommen, wird von KUCEROVA und POLIVKOVA (1977) mit 1 $\mu\text{g/ml}$ angegeben, ein Wert, der die Hälfte der durchschnittlichen therapeutischen Dosis betragen würde. Dies entspricht sicher nicht der Realität. In den eigenen Versuchen wurde die cytotoxische Dosis mit 400 $\mu\text{g/ml}$, bei OBE mit 500 $\mu\text{g/ml}$ ermittelt, wobei die Metaphasen aber nicht mehr cytogenetisch analysierbar waren. Der Grenzbereich bei VAN ZYL und WISSMÜLLER betrug 90 $\mu\text{g/ml}$, HAMPEL untersuchte nur einen Dosisbereich knapp über dem therapeutischen Bereich.

In den toxischen Konzentrationsbereichen zeigten alle sichtbaren Zellstrukturen, vor allem die Zell- und Kernmembran, Defekte. Begleitende pH-Messungen bei den eigenen Versuchen ergaben, daß ab einer Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$ die Puffersysteme von Blut und Kultur-

medium nicht mehr in der Lage waren, die Verschiebungen ins alkalische Milieu zu kompensieren. Der cytotoxische Effekt wird daher auch auf die pH-Verschiebung zurückgeführt.

4.3. Befunde im Mikro-Nucleus- und SCE-Test

Mit dem Mikro-Nucleus-Test (MNT) werden Kleinkerne in polychromatischen Erythrocyten des Knochemarks erfaßt. Sie entstehen aus acentrischen Fragmenten oder einzelnen Chromosomen, die an der Anaphasebewegung nicht teilgenommen haben, und zufällig in die Tochterzellen miteinbezogen wurden.

JENSEN und HÜTTEL (1976) verglichen bei Imurek^R-behandelten Patienten Befunde der Chromosomenanalyse und des MNT aus dem Knochemark. Bei allen 10 untersuchten Patienten wurden Kleinkerne in unterschiedlicher Häufigkeit nachgewiesen, wogegen nur die Hälfte strukturelle Chromosomendefekte (überwiegend Chromatidbrüche) aufwies.

Mit einer in jüngster Zeit entwickelten Färbetechnik (42, 59) können nach Einbau von Brom-desoxy-Uridin in die DNA die Schwesterchromatiden der Chromosomen unterschiedlich angefärbt, und Austauschprozesse (SCE) sichtbar gemacht werden. Nach in vitro Applikation menschlicher Lymphozyten mit Azathioprin (0,0001 µg/ml) fanden KUCEROVA und POLIVKOVA (1977) bei der herkömmlichen Chromosomenanalyse keine Effekte, wohl aber erhöhte SCE-Frequenzen. Vorläufige Befunde von SCE-Analysen, die in unserem Labor erhoben wurden (37), konnten diese Ergebnisse nicht bestätigen.

4.4. Teratogene Effekte

Im Rahmen der Diskussion über eine potentielle Mutagenität einer Substanz soll hier, neben Untersuchungsergebnissen der Chromosomenanalyse, noch kurz auf mögliche teratogene Effekte eingegangen werden.

LOWER und Mitarb. (1971) berichteten über den Fall einer nierentransplantierten, mit Imurek^R und Prednison^R behandelten Patientin, die nach normal verlaufener Schwangerschaft Zwillinge zur Welt brachte. Beide Kinder starben kurz nach der Geburt an einer Septikämie. Autopsisch wurden neben Hypoplasien von Knochenmark, lymphatischen Geweben und Nebennieren, auch eine Gaumenspalte festgestellt.

Einen weiteren Fall mit multiplen Mißbildungen des Urogenitalsystems und im Gaumen-Kiefer-Bereich beschreiben TALLENT et al (1970). Hier stand der Vater während der Konzeption unter einer immunsuppressiven Therapie mit Imurek^R und Prednison^R, nachdem ihm eine Fremdniere implantiert wurde.

Ob diese teratogenen Effekte tatsächlich auf Azathioprin zurückzuführen sind, erscheint fraglich, da in beiden Fällen postoperative Bestrahlungen mit 450 bzw. 1350 R durchgeführt wurden.

In unveröffentlichten Mitteilungen berichten COPE (1969) und ZIFF (1974) über 2 Fälle von Mißbildungen bei Kindern, deren Väter Azathioprin eingenommen hatten.

Im ersten Fall lag eine einseitige obere Phokomelie, im zweiten Mißbildungen des Intestinal- und Urogenitaltraktes, sowie Schäden an einer unteren Extremität vor. Eine detaillierte Anamnese ist leider nicht bekannt, so daß andere mutagene Einflüsse nicht ausgeschlossen werden können.

Gaumen- und Kieferdefekte könnten nach BONGIOVANI und MC PADDEY (1960) auch auf eine längere Prednisontherapie zurückzuführen sein.

Die Arbeitsgruppen von LEB (1971), PRICE (1976) und ZEUTHEN (1971) berichten über einzelne Fälle von phänotypisch gesunden Neugeborenen, die erhöhte Raten von Chromosomendefekten, vorwiegend allerdings gaps und einfache Brüche, aufwiesen. Ein Elternteil dieser Kinder nahm längerfristig Azathioprin ein, einige waren auch kurzzeitig therapeutisch bestrahlt worden. Bei Nachkontrollen dieser Befunde zeigte sich, daß in einem Zeitraum von 7 - 32 Monaten die Chromosomenschäden nicht mehr vorhanden waren.

Diesen Befunden steht eine Reihe von untersuchten Fällen gegenüber, bei denen trotz Imurekbehandlung während Konzeption oder Schwangerschaft, keine teratogenen Effekte nachweisbar waren (1, 7, 11, 19, 25, 27, 35, 66, 67). Es handelt sich z.T. auch um Studien mit größeren Patientenkollektiven, wobei mehr als 120 Neugeborene untersucht wurden.

Nicht nur das Zahlenverhältnis der untersuchten Fälle zugunsten der negativen Befunde, sondern auch die mögliche Einwirkung anderer Mutagene bei den positiven Befunden sprechen eher dafür, daß Azathioprin kein teratogener Effekt zugeschrieben werden kann. Bei der großen Anzahl Imurekbehandelter Patienten bewegen sich die wenigen bisher bekannten Fälle von Mißbildungen bei Neugeborenen durchaus in dem Rahmen, wie er auch bei gesunden Eltern auftritt.

In diesem Zusammenhang sei noch auf Untersuchungen von SAARIKOSI und SEPPÄLÄ (1973) hingewiesen, die entdeckten, daß Azathioprin die Plazentarschranke durchdringen kann, der Fetus also auch in der besonders empfindlichen Frühphase dem Medikament ausgesetzt ist. Die Autoren sind der Meinung, daß der Fetus unempfindlich gegenüber Azathioprin ist.

4.5. Cytogenetische Befunde in Tierversuchen

PAUFLER und Mitarb. (1975) analysierten Chromosomen in peripheren Lymphozyten von jeweils 10 männlichen und weiblichen Göttinger Miniaturschweinen. Nach einer täglichen Zufuhr von 5 mg Azathioprin pro kg Körpergewicht über einen Zeitraum von 4 Wochen, war der Prozentsatz an Lymphozyten mit Chromosomendefekten bei den Ebern geringgradig aber signifikant erhöht, bei den Sauen zeigte sich kein Unterschied im Vergleich zu den Kontrollen. 1977 bestätigte die gleiche Arbeitsgruppe ihre Ergebnisse, wobei die Raten aller aufgetretenen Aberrationstypen (Deletionen, gaps und einfache Chromatidbrüche jeweils gegenüber jenen der Kontrolltiere signifikant erhöht waren.

Bei vergleichenden Untersuchungen des Knochenmarks von Kleinsäugern (70, 71) zeigte Azathioprin Effekte bei der Chromosomenanalyse und im MNT, war jedoch SCE-negativ. Erhöhte Kleinkernzahlen wurden bei Azathioprin-behandelten Mäusen gefunden (29, 73).

4.6. Abschließende Bewertung

Die bisher vorliegenden Befunde über die cytogenetische Wirkung von Azathioprin in vitro und in vivo sind widersprüchlich. Die meisten Untersuchungen, nämlich 13, wurden in peripheren Lymphozyten, nur 5 Untersuchungen in Knochenmarkszellen durchgeführt. Bei positiven Befunden wurden überwiegend gaps, in geringerer Zahl strukturelle Chromosomendefekte mit offenen Brüchen - meist vom Chromatidtyp - jedoch kaum Strukturumbauten beobachtet.

Positive Effekte zeigt Azathioprin beim MNT in den polychromatischen Erythroblasten des Knochenmarks. Da

hier aber nicht zwischen strukturellen Defekten und Verteilungsstörungen unterschieden werden kann, ist daraus nicht unmittelbar eine clastogene Wirkung abzuleiten.

Es ist nicht auszuschließen, daß positive Befunde im Lymphozytensystem z.T. auf Einflüsse der Grundkrankheit zurückzuführen sind.

Die widersprüchlichen cytogenetischen Befunde sind vor allem durch die kaum standardisierten Kulturbedingungen mit unterschiedlichen Applikationsbedingungen sowie der oft ungenügenden mathematisch-statistischen Behandlung der Daten zu erklären. Vielfach dürften positive Befunde nur dadurch zustande gekommen sein, daß gaps mit strukturellen Chromosomendefekten, die auf echte Diskontinuitäten der Chromosomenstruktur zurückzuführen sind, zusammengefaßt wurden. Doch selbst VAN ZYL und WISSMÜLLER (1974), die bei 10 - 40fach höherer Dosierung als im therapeutischen Bereich erhöhte Aberrationsraten fanden, schreiben dem Azathioprin nur eine sehr schwache mutagene Wirkung zu. Hinzu kommt, daß wahrscheinlich mit interindividuellen Empfindlichkeitsschwankungen zu rechnen ist.

Auch die im Rahmen der Mutagenitätsprüfung jetzt häufig angewandte empfindliche SCE-Analyse zeigt keine einheitlichen Resultate. Zudem ist der Mechanismus des SCE noch nicht genau bekannt. Den Effekten liegen langlebige Läsionen in den DNA-Fibrillen der Schwesterchromatiden zugrunde, zwischen denen in der S-Phase Austauschprozesse stattfinden. Wahrscheinlich handelt es sich um einen anderen Typ von Läsionen, als bei jenen, die zu den klassischen Chromosomenaberrationen führen. Über die genetische, bzw. mutagene Bedeutung kann noch nichts genaues ausgesagt werden.

Die in der Literatur vorliegenden Ergebnisse zur cyto-genetischen Wirkung von Azathioprin zeigen, daß eine clastogene Wirkung nicht vollkommen ausgeschlossen werden kann. Aufgrund der vorgestellten kritischen Bewertung dieser Beobachtungen sowie der Befunde der eigenen Studie, ist es jedoch sicher gerechtfertigt, nur eine sehr schwache bis negative Wirkung anzunehmen.

5. Zusammenfassung

1. In vivo Untersuchungen: Bei 28 Patienten mit Multipler Sklerose, eingeteilt in Gruppen während, nach und ohne Therapie mit Azathioprin sowie bei 10 gesunden Kontrollpersonen, wurden Chromosomenanalysen in peripheren Lymphozyten durchgeführt. Von jedem Probanden wurden nach 48stündiger Kulturzeit 200 Metaphasen analysiert.

2. In vitro Experimente: Periphere Lymphozyten wurden unterschiedlich lange, und in verschiedenen Zellzyklusphasen mit Azathioprin in 3 therapeutischen Dosen (1, 2 und 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und 3 überhöhten Dosen (40, 100 und 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$) behandelt. Außerdem wurde eine Leerkontrolle getestet. Die Kulturzeit betrug 48 Stunden. Pro Konzentrationsstufe wurden 200 Metaphasen, pro Kontrolle 300 Metaphasen untersucht.

3. In geschädigten Zellen traten überwiegend gaps, selten Brüche vom Chromosomen- und Chromatidtyp, so gut wie nie Strukturumbauten auf. Weder bei den Untersuchungen der Probanden, noch bei den in vitro Experimenten konnte ein durch Azathioprin verursachter chromosomenschädigender (clastogener) Effekt beobachtet werden. Steigende Dosen und längere Einwirkungszeiten in vitro erhöhten die Anzahl geschädigter Zellen ebenso wenig, wie akkumulierte Dosen bei einzelnen Patienten.

4. Eine kritische Bewertung der in der Literatur vorliegenden Ergebnisse zeigt, daß eine clastogene Wirkung von Azathioprin nicht ganz ausgeschlossen werden kann. Die dabei angelegten Kriterien und die Befunde der eigenen Studie deuten aber auf eine nur sehr schwache bis negative Wirkung hin.

Literaturverzeichnis

1. Ahlmen, J., Gelin, L.E., Magnusson, S.
Graviditet efter Njurtransplantation (Pregnancy
after renal transplantation, engl. summary)
Läkartidningen 71 (1974) 2549-2552
2. Aya, T., Makino, S., Hirayama, A.
Some chromosomal studies in patients with
infectious hepatitis
Proc. Jap. Acad. 42 (1976) 1088-1093
3. Bär, U., Becker, H., May, B., Mayer, D.,
Ohlendorf, S., Otto, P., Schmitt, F.W.
Über die Pharmakokinetik des Azathioprin im Tier-
versuch und bei Patienten mit chronischen Leberer-
krankungen
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 79 (1973) 943-946
4. Bauchinger, M., Hug, O.
Chromosomenaberrationen nach Radium-Röntgen-Therapie
gynäkologischer Tumoren
Strahlentherapie 131 (1966) 109-121
5. Bauchinger, M., Schmid, E., Land, W.
Mitoseaktivität und Chromosomenanalyse in peri-
pheren Lymphozyten ALG-behandelter Patienten.
Klin. Wschr. 48 (1970) 499-501
6. Bauchinger, M., Schmid, E., Pieper, M., Zöllner, N.
Cytogenetische Wirkung von Cyclamat in menschlichen
peripheren Lymphozyten in vivo
Dtsch. Med. Wschr. 44 (1970) 2220-2223
7. Board, J.A., Lee, H.M., Draper, D.A., Hume, D.M.
Pregnancy following kidney homotransplantation from
a non-twin
Amer. J. Obstetr. Gynec. (1967) 318-323

8. Boll, I., Klimas, J., Willigerodt, B.
Die Wirkung von 6-Mercapto-Purin und Azathioprin
auf menschliches Knochenmark in vitro
Arzneim. Forsch. (Drug Res.) 21 (1971) 502-504
9. Bongiovanni, A.M., Mc Paddy, A.J.
Steroids during pregnancy and possible fetal con-
sequences
Fertil. and Steril. 11 (1960) 181-186
10. Bouroncle, B.A., Doan, C.A.
Refractory Idiopathic Thrombocytopenic Purpura
treated with azathioprine
New England Journal of Medicine 275 (1966) 630-635
11. Caplan, R.M., Dossetor, J.B., Maughan, J.B.
Pregnancy following cadaver kidney homotransplantation
Amer. J. Obstet. Gynec. 106 (1970) 644-648
12. Cave, M.D.
Reverse patterns of thymidine- H^3 incorporation
in human chromosomes
Hereditas 54 (1966) 338-355
13. Cope, E. 1969 nicht veröffentlicht, zit. bei
Mornington (1977)
14. De Miranda, P., Beacham, L., Creagh, H., Elion, G.
The metabolic fate of the methylnitroimidazole-
moiety of azathioprine in the rat
J. Pharmacol. Exp. Ther. 187 (1973) 588-601
15. Dreikorn, K., Ritz, E., Röhl, L., Lenhard, V.,
Gurland, H.J.
Nierentransplantationen: Aktueller Stand, Fort-
schritte und Probleme
Deutsches Ärzteblatt 47 (1976) 3007-3016

16. Dudin, G., Beek, G., Obe, G.
The human leucocyte test system I:
DNA-synthesis and mitosis in PHA-stimulated 2-day-
cultures
Mutat. Res. 23 (1974) 279-281
17. Eberle, P., Hunstein, W., Perings, E.
Chromosomes in patients treated with Imuran^R
Humangenetik 6 (1968) 69-73
18. El-Alfi, O.S., Smith, P.M., Bieseke, J.J.
Chromosome breaks in human leucocyte cultures in-
duced by an agent in the plasma of infectious
hepatitis patients
Hereditas 52 (1965) 285-295
19. 11th Report of the "Human Renal Transplant Registry"
JAMA 226 (1973) 1197-1204
20. Elion, G.B.
Significance of azathioprine metabolites
Proc. Soc. Med. 65 / 3 (1972) 257-260
21. Emerit, I., Marteau, R.
Chromosome studies in 14 patients with disseminated
sclerosis
Humangenetik 13 (1971) 25-33
22. Frick, E., Angstwurm, H., Blomer, R., Strauss, G.
Immunsuppressive Therapie der Multiplen Sklerose,
4. Mitteilung: Behandlungsergebnisse mit Azathioprin
und Antilymphozytenglobulin
Münch. Med. Wschr. 119 (1977) 1111-1114
23. Friedrich, U., Zeuthen, E.
Chromosomenabnormalitäten und Behandlung mit Imuran^R
(Azathioprin) nach Nierentransplantationen
Humangenetik 8 (1970) 289-294

24. Ganner, E., Osment, J., Dittrich, P., Huber, H.
Chromosomes in patients treated with azathioprine
Humangenetik 18 (1973) 231-236
25. Ginzler, E., Sharon, E., Diamond, H., Kaplan, K.
Long-termed maintenance therapy with azathioprine
in systemic Lupus Erythematosus
Arthritis Rheum. 18 (1975) 27-34
26. Goepel, W., Benkenstein, H., Banzhaf, M.
Immunosuppressive treatment of multiple sclerosis
with cyclophosphamide and Imuran - report on 57 cases
Dt. Gesund. Wes. 27 (1972) 1955-1961
27. Golby, M.
Fertility after renal transplantation
Transplantation 10 (1970) 201-207
28. Hampel, K.E., Lackner, A., Schulz, E., Busse, V.
Chromosomenmutationen durch Azathioprin bei mensch-
lichen Leukozyten in vitro
Z. Gastroenterologie 9 (1971) 47-51
29. Heddle, J.A., Bruce, W.R.
On the use of multiple assays for mutagenicity
especially the micronucleus, salmonella and sperm
abnormality assays
Progress in Genetic Toxicology 2 (1977) 265-274
30. Jensen, M.K., Sjøborg, M.
Chromosome aberrations in human cells following
treatment with Imuran^R
Acta Med. Scand. 179 (1966) 249-250
31. Jensen, M.K.
Chromosome studies in patients treated with azathio-
prine and amethopterin
Acta Med. Scand. 182 (1967) 445-455

32. Jensen, M.K.
Effect of azathioprine on the chromosome complement
of human bone marrow
Intern. J. Cancer 5 (1970) 147-151
33. Jensen, M.K., Hüttel, M.S.
Assessment of the effect of azathioprine on human
bone marrow cells in vivo, combining chromosome
studies and the micronucleus test
Dan. Med. Bull. 23 (1976) 152-154
34. Kaspar, H., Zimmerman, H.D., Nägele, E.
Azahtioprinbehandlung bei Enteritis regionalis
(M. Crohn)
Dtsch. Med. Wschr. 95 (1970) 1261-1265
35. Kaufmann, J.J., Dignam, W., Goddwin, W.E., Martin, D.C.,
Goldman, R., Maxwell, M.H.
Successful normal childbirth after kidney homo-
transplantation
JAMA 200 (1967) 162-165
36. Khonakarian, O.A., Burat, A.J., Skobelsky, M.D.
Chromosome complex in patients with disseminated
sclerosis (engl. summary)
Vestn. Akad. Med. Nauk. 22 (1967) 85-88
37. Kolin-Gerresheim, I. persönliche Mitteilung (1979)
38. Koulisher, L.
Etude cytogénétique de 9 malades atteints des
sclérose en plaques
Acta Neurol. Belg. 63 (1963) 437-442
39. Krajincanic, B., Zunic, Z., Lazarov, A.
Effect of some chemotherapeutics on frequency of
lymphocytes chromosomal aberrations in certain
systemic diseases
Mutat. Res. 53 (1978) 212-213

40. Kucerova, M.
Cytogenetic analysis of human chromosomes and its
value for the estimation of the genetic risk
Mutat. Res. 41 (1976) 123-130
41. Kucerova, M., Polivkova, Z.
Mutagenic effects of different mutagens on human
chromosomes in vitro as detected by conventional
and "Harlequin" methods
Progr. Genet. Toxicol. (proc. symp.) 2 (1977)
319-325
42. Latt, S.A.
Microfluorometric detection of desoxyribonucleic acid
replication in human metaphase chromosomes
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 70 (1973) 3395-3399
43. Leb., D.E., Weisskopf, B., Kanovitz, B.S.
Chromosome aberrations in the child of a kidney
transplant recipient
Arch. Intern. Med. 128 (1971) 441-444
44. Lorenzen, I., Videbaek, A.
Treatment of collagen diseases with cytostatics
Lancet II (1965) 558-561
45. Lower, G.D., Stevens, L.E., Najaran, J.S.,
Reemtsma, K.D.
Problems from immunosuppressives during pregnancy
Amer. J. of Obstetr. and Gynec. 111 (1971) 1120-1121
46. Mann, H.B., Whitney, D.R.
in: Lienert, G.A. (Hrsg.), Verteilungsfreie Methoden
in der Biostatistik, S. 106, Meisenheim am Glan, 1962
47. Markovic, V., Rolovic, Z., Moric-Petrovic, S.
Investigation of chromosomes before and after
treatment with Imuran^R, part I (engl. summary)
Anal. Zavoda za Mentalno Zdravie 2 (1970) 105-112

48. Matsaniotis, N., Kiossoglu, K.A., Maounis, F.,
Anagrostakis, D.E.
Chromosomes in infectious hepatitis
Lancet II (1966) 1421
49. Mella, B., Lang., D.J.
Leucocyte mitosis: suppression in vitro associated
with acute infectious hepatitis
Science 155 (1967) 80-81
50. Mella, B.
Chromosomal damage associated with infectious
hepatitis and its possible teratogenic significance
Neurology (Minneap.) 8 (1968) 741-744
51. Mertens, H.G., Hertel, G.
Immundepressive Behandlung der Myasthenien
Med. Welt 24 (1973) 955-963
52. Meyer zum Büschenfelde, K.H.
Zur immunsuppressiven Therapie der Chronischen
Hepatitis
Therapiewoche 23 (1973) 144-152
53. Mornington, B.
Nebenwirkungen von Azathioprin Imurek^R
10. Europäischer Kongress für Allergologie und
klinische Immunologie
Prag, September 1977
54. Müller-Wieland, K.
Zur Beeinflussbarkeit des Verlaufs der Colitis
ulcerosa durch Azathioprin. Vorläufige Mitteilung
Med. Klin. 69 (1974) 709-710
55. Obe, G.
Die Wirkung von 6-Mercapto-Purin und Azathioprin auf
menschliche Chromosomen in vitro
Arzneim. Forschung (Drug Res.) 21 (1971) 504-505

56. Paufler, S., Perings, E., Seidenkranz, H.G.,
Michelmann, H.W., Holtz, W., Smidt, D.
Untersuchungen zum Einfluß von Azathioprin auf das
Auftreten von Chromosomenanomalien beim Göttinger
Miniaturschwein
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 82 (1975) 319-322
57. Paufler, S., Laerum, A., Michelmann, H.W., Seiden-
kranz, H.G., Geldermann, H.G., Perings, E., Smidt, D.
Visuelle und elektronische Analyse der Chromosomen
von Göttinger Miniaturschweinen nach Verabreichung
von Azathioprin
Zbl. Vet. Med. A 24 (1977) 552-560
58. Perings, E., Rehn, K., Hunstein, W.
Therapieerfolge unter Azathioprin bei 11 Patienten
mit systematisiertem Lupus Erythematoses
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 76 (1970) 111-113
59. Perry, P., Wolff, S.
New Giemsa method for the differential staining
of sister chromatids
Nature 251 (1974) 156-158
60. Price, H.V., Salaman, J.R., Laurence, K.M.
Immunosuppressive drugs and the foetus
Transplantation 21 (1976) 294-298
61. Rickinson, A.B., Ilbery, L.T.
The effect of radiation upon lymphocyte response
to PHA
Cell Tissue Kinet. 4 (1971) 549-562
62. Roenigk, H.H., Deodhar, S.
Pemphigus treatment with azathioprine
Arch. Dermatol. 107 (1973) 353-357

63. Rossi, A., Sebastio, L., Ventruto, V.
Studio cromosomico in 14 soggetti psoriasici
trattati con idrossiurea o azathioprine
(engl. summary)
Minerva Med. 64 (1973) 1728-1732
64. Saarikoski, S., Seppälä, M.
Immunosuppression during pregnancy: transmission of
azathioprine and its metabolics from the mother to
the fetus
Am. J. Obstetr. Gynec. 115 (1973) 1100-1106
65. Schinzel, A., Schmid, W.
Lymphocyte chromosome studies in humans exposed to
chemical mutagens. Validity of the method in 67
patients under cytostatic therapy
Mutat. Res. 40 (1976) 139-166
66. Sharon, E., Jones, J., Diamond, H.
Pregnancy and azathioprine in systemic Lupus Erythema-
todes
Amer. J. Obstetr. Gynec. 118 (1974) 25-23
67. Symington, E.R., Mackay, I.R., Lambert, R.P.
Cancer and teratogenesis: infrequent occurrence
after medical use of immunosuppressive drugs
Austr. N.Z.J. Med. 7 (1977) 368-372
68. Tallent, M.D., Simmonds, R.I., Nojarian, M.
Birth defects in child of male recipient of kidney
transplant
JAMA 211 (1970) 1854-1855
69. Thumb, N., Vormittag, W.
Immunosuppressive therapy and chromosomal aberrations
in rheumatoid arthritis
Scand. J. Rheuma 8 (1975) 6-9

70. Tsuchimoto, T., Matter, B.E.
Comparison of micronucleus test and chromosome examination in detecting potential chromosome mutagens
Mutat. Res. 46 (1977) 240
71. Tsuchimoto, T., Matter, B.E.
Erfahrungen mit dem Mikro-Nukleus-Test im Vergleich zu anderen Methoden
Workshop Cytogenetik des Knochenmarks, Ges. für Umwelt- und Mutationsforschung Berlin 1978
72. Unglaub-Leisten, I., Stickl, H., Frick, E., Angstwurm, H., Ring, J.
Chromosomenuntersuchungen an peripheren Lymphozyten bei Patienten mit multipler Sklerose
Dtsch. Med. Wschr. 100 (1975) 2028-2034
73. Van Went, G.F.
Mutagenicity testing of three halucinogens: LSD, Psilocybin and Δ^9 -THC, using the micronucleus test
Experientia 34 (1978) 324-325
74. Van Zyl, J., Wissmüller, H.F.
The clastogenic effect of azathioprine on human chromosomes in vitro
Humangenetik 21 (1974) 153-165
75. Vormittag, W.
Zytostatische immunodepressive Therapie, chromosomale Aberrationen und karzinogene Wirkung
Wien. Klin. Wschr. 86 (1974) 69-75
76. Warnatz, H.
Immunsuppressive Therapie bei primär chronischer Polyarthrititis
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 78 (1972) 771-774

77. Weber, E.
Grundriß der Biologischen Statistik, Stuttgart 1967
78. Weinberg, A.L.
Side-effects of immunosuppressants with special
reference to thiopurines
Progress in Immunology II, vol. 5, Amsterdam 1974
79. White, R.H.R., Cameron, J.S., Trounce, J.R.
Immunosuppressive therapy in steroid-resistant
proliferative glomerulonephritis accompanied by
the nephrotic syndrome
Britt. Med. J. 2 (1966) 853-860
80. Wright, E.V., Bates, D.
A chromosome study in multiple sclerosis
Humangenetik 18 (1973) 349-352
81. Younkin, L.H.
In vitro response of lymphocytes to phytohaemag-
glutinin (PHA) as studied with antiserum to PHA
II. Cell. cycle analysis
Exp. Cell. Res. 90 (1975) 374-380
82. Zeuthen, E., Friedrich, U.
Chromosomenuntersuchungen bei Kindern von Imuran-
behandelten Eltern
Humangenetik 12 (1971) 74-76
83. Ziff, M., 1974, personal communication, zitiert bei
Mornington (1977).

Für die Überlassung des Themas, der Bereitstellung
eines Laborplatzes und hervorragende Betreuung möchte
ich herzlich Herrn Prof. Dr. M. Bauchinger danken.
Mein Dank gilt auch Frau R. Giesen für ihre Mithilfe
bei der Durchführung der Experimente und Herrn
Priv.-Doz. Dr. E. Schmid für kritische Anregung,
sowie Herrn Prof. Dr. E. Frick und Herrn Dr. H.
Angstwurm von der Neurologischen Universitätsklinik
München für die Vermittlung von Patienten.
Nicht zuletzt möchte ich auch Frau I. Straßer für
die Erstellung des Manuskripts danken.

